

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M.H

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

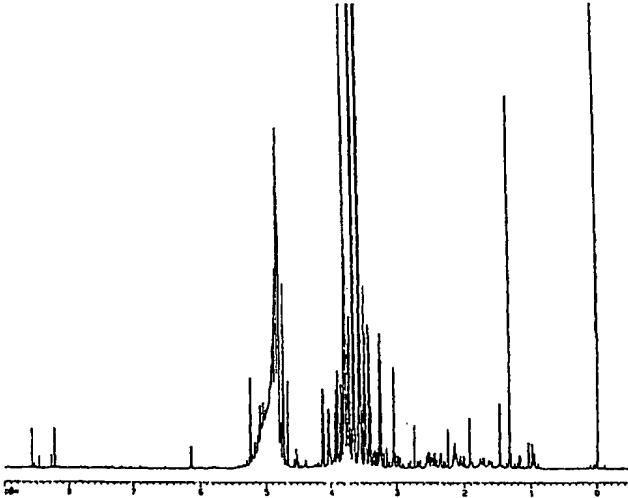
(51) Internationale Patentklassifikation 7 : G01N 33/92		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/10014
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. Februar 2000 (24.02.00)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05911</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 11. August 1999 (11.08.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 36 617.5 12. August 1998 (12.08.98) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: FREI, Ulrich [DE/DE]; Paulstrasse 23, D-10557 Berlin (DE). DANNE, Oliver [DE/DE]; Döberitzer Weg 11, D-14476 Seeburg (DE). ZSCHUNKE, Adolf [DE/DE]; Peitzerweg 10, D-12527 Berlin (DE). MÜGGE, Clemens [DE/DE]; Achtermann Strasse 57, D-13187 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwälte: LIESEGANG, Eva usw.; Boehmert & Boehmert, Franz-Joseph-Strasse 38, D-80801 München (DE).</p>			
<p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>			

(54) Title: IN-VITRO METHOD FOR DETECTING AND DIAGNOSING ACUTE CORONARY SYNDROMES

(54) Bezeichnung: IN VITRO VERFAHREN ZUR ERKENNUNG UND DIAGNOSTIK AKUTER KORONARER SYNDROME

(57) Abstract

The invention relates to an in-vitro method for detecting acute coronary syndromes, especially of the acute myocardial infarction, by determining and assessing the content of choline, choline and/or trimethyl ammonium derivatives, selected from the group which comprises phosphorylcholine, plasmalogens and lysoplasmenylcholine, and/or from the reaction products thereof, selected from the group which comprises 1-O-alk-1'-enyl-2-substituted glycerol and 1-O-alk-1'-enyl-2-substituted glycerol phosphate, in body fluids or body parts. The inventive method comprises the following steps: withdrawing a sample of a suitable body fluid or of a body part, determining the content of choline, choline and/or trimethyl ammonium derivatives, selected from the group which comprises phosphorylcholine, plasmalogens and lysoplasmenylcholine, and/or from the reaction products thereof, selected from the group which comprises 1-O-alk-1'-enyl-2-substituted glycerol and 1-O-alk-1'-enyl-2-substituted glycerol phosphate, using a suited determination method (nuclear magnetic resonance methods, biochemical, enzymatic, immunological, clinicochemical, chromatographic, mass spectrometric, electrochemical, photometric methods or other methods); and assessing the measured results while taking a limiting value into consideration in order to detect or diagnose acute coronary syndromes, especially of an acute myocardial infarction.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein in vitro Verfahren zur Erkennung akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, durch die Bestimmung und Bewertung des Gehaltes von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, und/oder ihren Reaktionsprodukten, ausgewählt aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt, in Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen, welches folgende Schritte umfaßt: Entnahme einer Probe einer geeigneten Körperflüssigkeit oder eines Körperbestandteils, Bestimmung des Gehaltes von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, und/oder ihren Reaktionsprodukten, ausgewählt aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt, mit einer geeigneten Bestimmungsmethode (Kernspinresonanz-Methoden, biochemische, enzymatische, immunologische, klinisch-chemische, chromatographische, massenspektrometrische, elektrochemische, photometrische Methoden oder andere Methoden); und Bewertung der Meßergebnisse unter Berücksichtigung eines Grenzwertes zur Erkennung bzw. zum Ausschluß akuter koronarer Syndrome, insbesondere eines akuten Myokardinfarktes.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

10 In vitro Verfahren zur Erkennung und Diagnostik
akuter koronarer Syndrome

15 Die Erfindung betrifft ein in vitro Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer
Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes (AMI), beim Menschen.

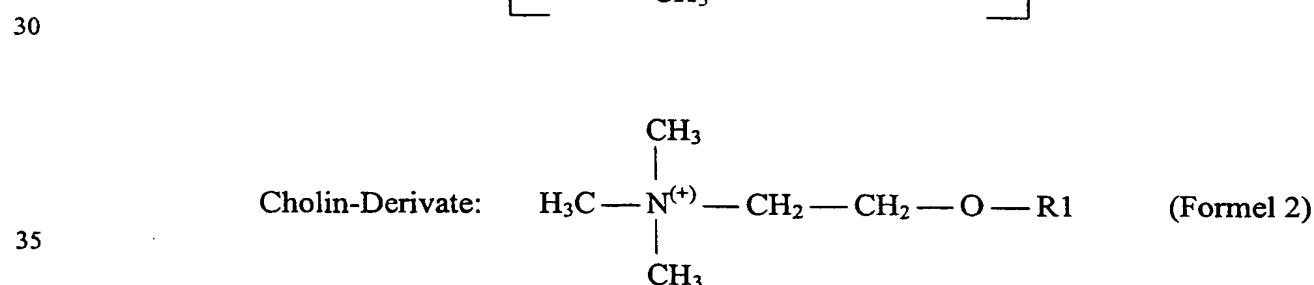
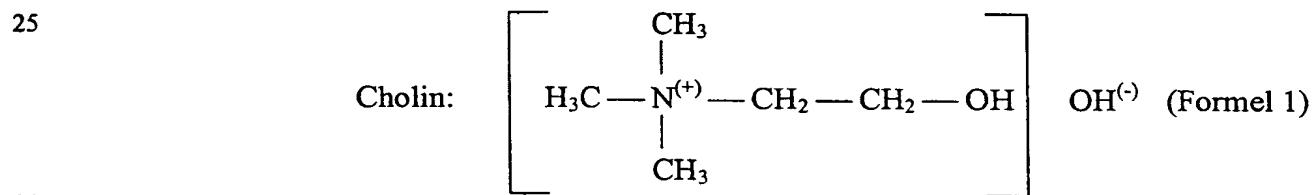
Akute koronare Syndrome umfassen die Krankheitsbilder des akuten Myokardinfarktes (AMI) und der instabilen Angina pectoris, welche durch die WHO-Klassifikation des AMI und die Braunwald-Klassifikation der instabilen Angina pectoris definiert werden (Gillum
20 R.F. et al. 1984, Am Heart J 108: 150-158; Braunwald E. et al. 1994, Circulation 90: 613-622). Akute koronare Syndrome stellen einen häufigen und lebensbedrohlichen Erkrankungskomplex dar, bei dem die frühzeitige sichere Diagnose und Therapie entscheidend für das Überleben des Patienten sein kann. Dies trifft besonders auf den akuten Myokardinfarkt zu, bei dem eine Verzögerung der richtigen Diagnose und Therapie schwerwiegende Folgen für
25 den Patienten hat. Bekannte Methoden zum Diagnostizieren eines Myokardinfarktes sind das Elektrokardiogramm und die Bestimmung verschiedener Labor-Marker. Das Elektrokardiogramm und die bisher bekannten Labor-Marker haben in der Frühphase des akuten Myokardinfarktes eine zu geringe Sensitivität, um bei einer Mehrheit der Patienten die Diagnose stellen zu können. So liegt die Sensitivität von infarkt-typischen Veränderungen im EKG (ST-
30 Hebungen) bei 46 % (Rude, R.E. et al. 1983, Am J Cardiol 52:936-942). Die Sensitivität der Labor-Marker Creatinkinase (CK)-Aktivität, CK-MB-Aktivität, CK-MB-Masse, der CK-MB-Isoformen, von Myoglobin und kardialen Troponinen liegt in den ersten 2 Stunden nach Schmerzbeginn zwischen 11-29 % (Mair, J. et al. 1994, Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie 25: 1-6). Die begrenzte diagnostische Brauchbarkeit der bekannten Verfahren in der Frühphase des akuten Myokardinfarktes verursacht eine Reihe von klinischen Problemen wie die Gefahr von Fehldiagnosen, die Durchführung nicht-indizierter Therapien und die Verzögerung lebensrettender Therapien.

Bei der instabilen Angina pectoris können Risikopatienten durch die Bestimmung der kardialen Troponine relativ zuverlässig erkannt werden, die langsame Freisetzungskinetik bedingt aber, daß es auch hier in der Frühphase zu falsch-negativen Befunden kommt. Dies ist problematisch, weil diese Patienten eine ähnlich schlechte Prognose wie Patienten mit AMI 5 haben können und eine rasche und gezielte antiischämische Therapie benötigen. Es besteht daher ein erheblicher Bedarf an Verfahren, die eine zuverlässige und frühzeitige Erkennung akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, ermöglichen.

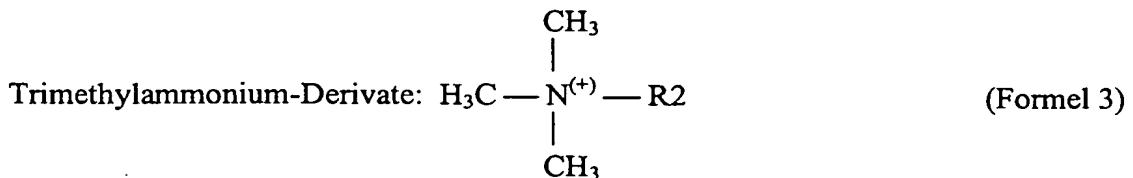
Die Erfindung hat daher zur Aufgabe, eine Methode anzugeben, welche die frühzeitige Er- 10 kennung akuter koronarer Syndrome ermöglicht und somit die Diagnose und Therapie der erkrankten Patienten verbessert.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen von Anspruch 1 gelöst. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Erkennung akuter koronarer Syndrome, insbesondere des 15 akuten Myokardinfarktes, wird der Gehalt von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, in Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen, die einem Patienten entnommen wurden, bestimmt und bewertet.

20 Cholin, Cholin- und Trimethylammonium-Derivate, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, sind Moleküle des Lipidstoffwechsels und werden im folgenden zusammenfassend als "CCTD" bezeichnet. CCTD haben folgende chemische Formeln:



R1 = Rest 1



R2 = Rest 2

10 R1 und R2 stellen bestimmte chemische Substituenten dar, die die Substanzgruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, charakterisieren. Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin enthalten in diesen Molekül-Anteilen eine Alkenyl-Gruppe.

15 Die Formel 1 zeigt, daß Cholin [2-Hydroxyethyl]trimethylammonium mit seinem Gegenion darstellt. Formel 2 zeigt die allgemeine chemische Formel für Cholin-Derivate und Formel 3 stellt die allgemeine Formel für Trimethylammonium-Derivate wie Phosphorylcholin und Plasmalogene wie Plasmenylcholin und Lysoplasmenylcholin dar. Die negative Ladung kann sich im gleichen Molekül oder in einem Gegenion befinden. Die Mehrzahl der CCTD sind entweder Bestandteile von Phospholipiden, welche Bausteine von biologischen Membranen darstellen oder eng mit dem Stoffwechsel der Phospholipide verbunden sind. Herzmuskelzellen sind besonders reich an Plasmenylcholinen, welche cholinhaltige Phospholipide darstellen, die eine charakteristische Alkenyl-Gruppe im Molekül besitzen. Plasmenylcholine sind zudem Bestandteile von Membranen der Mitochondrien, die einen bedeutsamen Teil der Myokardmasse ausmachen. Die Aktivierung von verschiedenen myokardialen Phospholipasen in der Frühphase des akuten Myokardinfarktes sowie die Störungen des Lipidstoffwechsels bei schwerer Myokardischämie führen entsprechend den Ergebnissen der Anmelder zu einer ausgeprägten Freisetzung von Cholin, Cholin-Derivaten und der chemisch verwandten Trimethylammonium-Derivate, wie Phosphorylcholin, Plasmalogenen oder Lysoplasmenylcholin, und verursachen eine Zunahme der Konzentration der CCTD in bestimmten Körperflüssigkeiten und Körperbestandteilen. Inwieweit nicht-myozytäre Elemente einschließlich der Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen daran beteiligt sind, ist nicht bekannt. Die chemische Verwandtheit von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, und ihr gleichartiges Verhalten bei pathophysiologischen Prozessen, d.h. die sehr frühzeitige Freisetzung aus dem Herzen durch die ischämische Membrandestruktion,

20 25 30 35

35 begründet die zusammenfassende Betrachtungsweise als CCTD.

Die möglichen Unterschiede der einzelnen CCTD treten vor der entscheidenden Gemeinsamkeit einer sehr raschen myokardialen Freisetzung bei akuten koronaren Syndromen in den Hintergrund, zumal diese Gemeinsamkeit entscheidend für das erfindungswesentliche Merkmal des Verfahrens bei der Frühdiagnostik in den ersten Stunden nach Schmerzbeginn ist.

Die diagnostische Nutzung der Freisetzung von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, zur Erkennung akuter koronarer Syndrome und des akuten Myokardinfarktes beim Menschen ist bisher noch nicht beschrieben worden. Bekannt ist lediglich, daß bei experimentellen Versuchsanordnungen in der Frühphase der Myokardischämie ein Anstieg von Lysophosphoglyceriden (z.B. Lysophosphatidylcholin) im Myokard sowie im venösen und lymphatischen Effluat zu beobachten ist (Corr P.B. et al. 1987, J Mol Cell Cardiol 19: 34-53; Snyder D.W. 1981, Am J Physiol 241: H700-H707; Akita H. et al. 1986, J Clin Invest 78: 271-280). Dabei wurde aber in keiner Publikation ein Verfahren für die Bewertung des Gehaltes von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, in Körperflüssigkeiten für die Diagnose eines akuten koronaren Syndroms bzw. eines akuten Myokardinfarktes beim Menschen eingesetzt. Hintergrund der genannten Publikationen ist vielmehr die Beobachtung, daß Lysophosphatidylcholin offenbar proarrhythmische Effekte hat und daß Medikamente, die einen Anti-Lysophosphatidylcholin-Effekt haben, möglicherweise sinnvolle Therapeutika sein könnten.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, wie Phosphorylcholin, Plasmalogenen und Lysoplasmenylcholin und oder bestimmten Reaktionsprodukten zur Frühdiagnostik akuter koronarer Syndrome. Dabei muß zwischen nicht-erfindungsgemäß Diacyl-Phosphatidylcholinen und erfindungsgemäß Plasmenylcholinen unterschieden werden. In der gleichen Weise müssen die nicht-erfindungsgemäß Lysophosphatidylcholine mit einer Acyl-Gruppe im Molekül von den erfindungsgemäß Lysoplasmenylcholinen mit einer Alkenyl-Gruppe im Molekül unterschieden werden. Unspezifische Bestimmungsverfahren, die die erfindungsgemäß Substanzen nicht von anderen Phospholipiden oder ihren Bestandteilen differenzieren, weisen nicht die Merkmale des erfindungsgemäß Verfahrens auf, die für die Frühdiagnostik von akuten koronaren Syndromen wesentlich sind, und können daher mit dem Verfahren nicht gleichgestellt werden.

So zeigen unspezifische Bestimmungsverfahren der Gesamtgruppe von Plasma-, Serum- oder Vollblut-Phospholipiden oder Lysophosphatidylcholinen nicht die Charakteristiken des erfindungsgemäßen Verfahrens bei der Frühdiagnostik akuter koronarer Syndrome. Diese in der Literatur beschriebenen unspezifischen Verfahren von Phospholipiden messen im Blut im wesentlichen hepatische Phospholipide, die eben gerade nicht die erfindungsgemäßen Plasmacylcholine und Lysoplasmacylcholine enthalten, sondern zu einem ganz überwiegenden Teil Cholin-Phospholipide ohne Alkenyl-Gruppe, z.B. Diacyl-Phosphatidylcholin, beinhalten. Da diese nicht erfindungsgemäßen Bestimmungsverfahren also gerade nicht die Substanzen spezifisch messen, die bei akuten koronaren Syndromen aus dem Herzen ins Blut freigesetzt werden, besitzen Sie auch nicht die Merkmale des erfindungsgemäßen Verfahrens. Mit den nicht-erfindungsgemäßen Bestimmungsverfahren von Phospholipiden werden beim Myokardinfarkt so entweder gar keine signifikanten Veränderungen oder sogar Konzentrationsverminderungen gemessen, was verdeutlicht, daß diese Verfahren eine Freisetzung von Substanzen aus dem Herzen mit einer entsprechenden Konzentrationszunahme im Blut nicht erfassen. Bei der Bestimmung der gesamten Gruppe von Lysolecithinen mißt man beispielsweise beim akuten Myokardinfarkt häufig eine Konzentrationsabnahme, da es im Rahmen der unspezifischen akuten Phase Reaktion zu einer verminderten Bildung verschiedener Acyl-Lysophosphatidylcholine durch eine Reduktion der Aktivität der Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase (LCAT) kommt. Messungen mit unspezifischen Bestimmungsverfahren von Phospholipiden führen also häufig sogar zu entgegengesetzten Ergebnissen und Schlußfolgerungen, die für das erfindungsgemäße Verfahren nicht zutreffen.

Dabei läßt sich das erfindungsgemäße Verfahren mit verschiedenen analytischen Techniken durchführen, solange die erfindungsgemäßen Substanzen ausreichend spezifisch bestimmt werden können. So ist z.B. eine NMR-Spektroskopie, nach präanalytischer Zentrifugalultrafiltration der Probe und Entfernung protein-gebundener schlecht löslicher Diacyl-Phosphatidylcholine möglich. Ebenso können chromatographische, biochemische oder immunologische Bestimmungs-Techniken oder andere Methoden angewendet werden. Dabei kann das analytische Vorgehen in Anlehnung an publizierte Bestimmungsmethoden, wie z.B. biochemische bzw. enzymatische Methoden (Takayama, M. et al. 1977, Clin Chim Acta 79: 93-98), Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) (Brouwers, J.F.H. et al. 1998, J Lipid Res 39: 344-353; Potter, P. et al. 1983, J Neurochem 41: 188-94) sowie Gaschromatographie und/oder Massenspektrometrie (Myher, J.J. et al. 1989, Lipids 24: 396-407; Pomfret, A. et al. 1989, Anal Biochem 180: 85) oder immunologische Methoden (Smal, M.A. et al 1991, Lipids 26: 1130-1135; Baldo, B.A. et al 1991, Lipids 26: 1136-1139) vorgenommen werden. Über-

sichten zur Analytik von Phospholipiden wurden von Olsson publiziert (Olsson, N.U. et al.). Auf diese Veröffentlichungen wird Bezug genommen.

Bei erfindungsgemäßen biochemischen Methoden werden beispielsweise durch Hinzugabe von Reagenzien (z. B. Enzymen) chemische Reaktionen bzw. Reaktionsprodukte erzeugt, die dann die Detektion und Messung der Gesamtgruppe, einer Subgruppe oder Subspezies der CCTD ermöglichen (siehe Anwendungsbeispiele).

Bei erfindungsgemäßen immunologischen Methoden werden beispielsweise durch den Einsatz von immunologischen Reagenzien (z. B. Antikörpern), in der Regel in Kombination mit weiteren chemischen und/oder immunologischen Reagenzien, Reaktionen bzw. Reaktionsprodukte erzeugt, die dann die Detektion und Messung der Gesamtgruppe, einer Subgruppe oder Subspezies der CCTD ermöglichen (siehe Anwendungsbeispiele).

Bei erfindungsgemäßen chromatographischen Methoden wird beispielsweise, nach Vorbereitung der Probe, eine Stofftrennung durch die Verteilung zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase mit entsprechenden qualitativen und quantitativen Aussagen zu CCTD durchgeführt (siehe Anwendungsbeispiele).

Für jedes analytische Verfahren von CCTD und ihren Reaktionsprodukten sollte berücksichtigt werden, daß einige CCTD Einzelschichten, Doppelschichten, Membranen, Mizellen und/oder Vesikel bilden können, und daß diese Phänomene bedeutsam für die Analytik sein können.

Je nach gewählter Bestimmungstechnik sind quantitative Aussagen zu einzelnen, bestimmten Gruppen oder der gesamten Gruppe der erfindungsgemäß bestimmten Substanzen in dem Verfahren möglich. Die genannten Druckschriften werden durch Bezugnahme in die vorliegende Anmeldung aufgenommen.

Bei der kardialen Freisetzung von CCTD im Rahmen der ischämischen Membranestruktion von Herzmuskelzellen sind bestimmte aktivierte Phospholipasen von Bedeutung. Diese Phospholipasen spalten Phospholipide auf, so daß neben CCTD auch einfache Reaktionsprodukte entstehen, die zwar keine Trimethylammonium-Gruppe tragen, aber in gleicher Weise freigesetzt werden. Da diese einfachen Reaktionsprodukte der CCTD Teil eines gemeinsamen Freisetzungsmechanismus sind, ist das Verfahren auch durch die Bestimmung solcher einfachen Reaktionsprodukte möglich. Neben der Phospholipase A₂, die u.a. zur Freisetzung von dem genannten Lysoplasmenylcholin beträgt, sind weitere wichtige Enzyme dieser Gruppe die

Phospholipasen C und D, die die Esterbindung zwischen der Hydroxy-Gruppe am 3-sn-C-Atom des Glycerols und dem Phosphorylcholin (Phospholipase C) oder die Bindung zwischen der Phosphorylgruppe des 1,2-substituierten Glycerolphosphats und dem mit der Phosphorylgruppe veresterten Cholin angreift (Phospholipase D). Reaktionsprodukte der Aktivität dieser beiden Phospholipasen in Einwirkung auf die Plasmalogene sind demzufolge 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol (durch Phospholipase C) bzw. 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat (durch Phospholipase D). Diese Reaktionsprodukte werden zusammen mit Cholin bzw. Phosphorylcholin frei, wenn die genannten Phospholipasen auf Plasmenylcholine einwirken. Somit kann das erfindungsgemäße Verfahren zur Frühdiagnostik akuter koronarer Syndrome durch die Bestimmung von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, und/oder deren Reaktionsprodukte, ausgewählt aus der Gruppe die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt, durchgeführt werden.

Neben der gesteigerten Aktivität von Phospholipasen können folgende weitere Vorgänge ursächlich für den Anstieg von CCTD und ihren Reaktionsprodukten sein: Verminderter Abbau und/oder gesteigerte Synthese von CCTD und ihren Reaktionsprodukten (mit entsprechenden Änderungen der dafür verantwortlichen Enzyme) und die Freisetzung aus zellulären Kompartimenten und Membranen durch sonstige Faktoren (mechanische Faktoren, Zellschwellung und andere Phänomene der myozytären Schädigung.)

Die Erfindung wird an folgenden Ausführungsbeispielen erläutert.

Fig. 1 zeigt ein ^1H -NMR-Spektrum einer Blutprobe eines Patienten;

Fig. 2 zeigt vergrößerte Ausschnitte von zur Figur 1 analogen Spektren bei einem Patienten mit akutem Myokardinfarkt (A) und bei einem Patienten ohne akuten Myokardinfarkt (B). Analoge Erhöhungen der Fläche von $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Singulets der CCTD können bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt beobachtet werden.

Fig. 3. zeigt die Daten zur diagnostischen Wertigkeit von CCTD für die Diagnose eines akuten Myokardinfarktes im gesamten Prüfzeitraum;

Fig. 4. zeigt die Daten zur diagnostischen Wertigkeit von CCTD für die Diagnose eines akuten Myokardinfarktes in der Frühphase des AMI (0 bis 6 Stunden);

Fig. 5. zeigt die Daten zur diagnostischen Wertigkeit von CCTD für die Diagnose eines akuten Myokardinfarktes in der Frühphase des AMI (0 bis 3 Stunden); und

5 Fig. 6. zeigt die Daten zur diagnostischen Wertigkeit von CCTD für die Diagnose eines akuten Myokardinfarktes in der Spätphase des AMI (7 bis 35 Stunden).

Auswahl und Entnahme einer geeigneten Probe einer Körperflüssigkeit*

Für die Durchführung des Verfahrens ist die Entnahme einer Probe einer Körperflüssigkeit 10 notwendig. Dabei ist die diagnostische Wertigkeit des Verfahrens abhängig von der gewählten Körperflüssigkeit. Die Durchführung des Verfahrens ist beispielsweise durch die Untersuchung von Blutproben bzw. verarbeiteten Blutproben wie Plasma, Serum oder Vollblut möglich. Neben Blutproben können für das Verfahren auch andere Körperflüssigkeiten, wie z.B. Harn, untersucht werden. CCTD werden zu einem bestimmten Teil glomerulär 15 filtriert und erscheinen daher z.T. auch im Harn. Dabei ist aber im Vergleich zu Untersuchungen in Blutproben mit einer zeitlichen Verzögerung von Konzentrationsänderungen zu rechnen, was ein Nachteil der Verwendung von Harn darstellt. Zudem lässt sich Harn nicht in jedem Fall so unkompliziert und rasch gewinnen wie Blut, was ebenfalls ein Nachteil darstellt. Vorteilhaft bei der Verwendung von Harnproben ist die Tatsache, daß häufig größere Probenmengen zur Verfügung stehen und daß durch die Messung einer Konzentration in einer 20 Harnprobe, die über einen größeren Zeitraum produziert worden ist, auch pathophysiologische Vorgänge über ein größeres Zeitintervall erfaßt werden können. Dennoch ist aus den genannten Gründen für die Durchführung des Verfahrens die Verwendung von Blutproben bzw. verarbeiteten Blutproben sinnvoll. Die Bestimmung in anderen Körperbestandteilen und Körperflüssigkeiten, wie Gewebeproben, Lymphe oder Kapillarblut kann 25 sinnvoll sein. Bei der Probenabnahme sollten weitere Punkte berücksichtigt werden. Die exogene Zufuhr größerer Mengen von Cholin, Cholin-Derivaten oder Trimethylammonium-Derivaten vor der Probenabnahme sollte ausgeschlossen werden. Außerdem sollte für die Früherkennung akuter koronarer Syndrome die Probenabnahme auch so früh wie möglich erfolgen und gegebenenfalls periodisch wiederholt werden.

Bestimmung von CCTD in der Probe einer Körperflüssigkeit

Das erfindungsgemäße Diagnostizier- und Bewertungsverfahren ist weitgehend unabhängig von der Bestimmungsmethode, solange eine ausreichende Spezifität für einzelne, eine Untergruppe oder alle der erfindungsgemäß bestimmten Substanzen besteht. Die erfindungsgemäß bestimmten Substanzen sind Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivate, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysophosphatidylcholin umfaßt, sowie bestimmte einfache Reaktionsprodukte der CCTD, ausgewählt aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol-10
phosphat umfaßt. Als ein Ausführungsbeispiel wurde die ^1H -NMR-Spektroskopie gewählt, die als primäres Meßverfahren auch zur Validierung verwendet werden kann. Neben Kernspinresonanz(NMR)-Methoden können auch biochemische, enzymatische, immunologische, klinisch-chemische, chromatographische, massenspektrometrische, elektrochemische, photometrische Methoden oder andere Methoden eingesetzt werden, solange mit hoher Selektivität
15 kardial freigesetzte CCTD (bzw. deren einfache Reaktionsprodukte) bei Patienten mit Verdacht auf akute koronare Syndrome bestimmt werden.

Klinisch-chemische oder andere Methoden sowie Schnelltests zur Bestimmung von CCTD sollten vor ihrer Anwendung auf ihre analytische Qualität überprüft und validiert werden. Für
20 die Anwendung zur Diagnostik von akuten koronaren Syndromen sollten dabei möglichst nur solche Methoden eingesetzt werden, die sich im Vergleich zur ^1H -NMR-Spektroskopie diagnostisch als weitgehend gleichwertig oder überlegen erweisen. Die im folgenden genannten methodischen Ausführungen stellen Beispiele dar; d.h. qualitativ oder quantitativ andere Chemikalien, Lösungen, Reagenzien und Geräte können eingesetzt werden, wenn damit vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Grundsätzlich reicht für die Durchführung des Verfahrens die Anwendung *einer* validen Meßmethode für CCTD in *einer* geeigneten Körperflüssigkeit.

Ausführungsbeispiel: Bestimmung von CCTD mittels ^1H -NMR-Spektroskopie

30

Probenvorbereitung

- Abnahme von 10 ml Blut

Verarbeitung der Blutprobe je nach gewähltem Probenmaterial (Serum, Plasma oder Vollblut)

35

- Zentrifugalultrafiltration von 4 ml Probenmaterial über einen 10-kD-Filter (z.B. Ultrafree-4 B10; Millipore)
- Pipettieren von 600 μ l Ultrafiltrat in ein 5-mm-NMR-Röhrchen (z.B. 527-PP-7, Willmad, Buena, USA)
- 5 • Pipettieren von 100 μ l einer 3,5-mM-d₄-TSP-D₂O- Lösung als Konzentrationsstandard auf ein Probevolumen von 700 μ l (TSP = Natrium-Salz der Trimethyl-Silylpropion-Säure)
- pH-Messung im 5-mm-NMR-Röhrchen (z.B. 3-mm-Minitrode, Hamilton) unmittelbar prä- oder postanalytisch

Hochauflösende ¹H-NMR-Spektroskopie

10 Die ¹H-NMR-Spektren werden beispielsweise an einem 600 MHz-Spektrometer (z.B. Bruker AMX 600) unter folgenden Bedingungen aufgenommen:

- Single-Pulse-Technik
- 15 • Wasserunterdrückung mit der Vorsättigungstechnik
- 30-90° RF-Impuls
- 5-15 sec Pulsrepetitionszeit
- 64-128 Scans pro Probe
- 20 Die ¹H-chemischen Verschiebungen werden auf TSP_i intern bezogen. Die Charakterisierung von CH-, CH₂- und CH₃- Gruppen sowie weiterer protonentragender Gruppen bekannter Substanzen wird anhand publizierter ¹H-Shift-Daten vorgenommen. Zusätzlich können Protonenresonanzen in unabhängigen Untersuchungen durch Addition von gereinigten Substanzen zugeordnet werden. Die Konzentrationsbestimmung einzelner Substanzen wird durch Be-25 stimmung der Integrale der entsprechenden Protonenresonanzen und des TSP_i-Konzentrationsstandards unter Berücksichtigung der jeweiligen Protonenzahl und des Verdünnungsfaktors vorgenommen. Dabei wird die quantitative Auswertung der Spektren nach folgender Formel durchgeführt:

$$30 C_M = F_d \frac{C_{TSP} A_M N_{TSP}}{A_{TSP} N_M} \quad (\text{Formel 4})$$

C_M = Konzentration des Metaboliten (M)

35 C_{TSP} = Konzentration des Konzentrationsstandards

A_M = Integral unterhalb des Peak of Interest (M)

A_{TSP} = Integral des Konzentrationsstandards

F_d = Verdünnungsfaktor durch die Hinzugabe des Konzentrationsstandards

N_M = Anzahl der M - Protonen

N_{TSP} = Protonenanzahl des Konzentrationsstandards

5

Die Methodik wurde von den Anmeldern für die Bestimmung von niedrig-molekularen Substanzen validiert und korreliert mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0.998$ mit enzymatischen Methoden. Fig. 1 zeigt ein ^1H -NMR-Spektrum eines Patienten. Das typische Singulett der $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppe von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten ist in den ^1H -NMR-Spektren in der Regel in einem Bereich zwischen 2,5-4,5 ppm nachweisbar. Veränderungen der Protonen-Resonanzen sind durch verschiedene präanalytische Einflüsse, wie durch den pH möglich, die theoretisch zu Verschiebungen, Aufspaltungen und Überlagerungen führen können und daher bei der Auswertung berücksichtigt werden müssen. Es ist sinnvoll, die chemischen Verschiebungen der CCTD-Protonenresonanzen für die gewählten Untersuchungsbedingungen der NMR-Analytik in separaten Untersuchungsreihen genau zu bestimmen. Das $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Singulett eignet sich besonders für die Quantifizierung, weil es neun äquivalente Protonen repräsentiert. Ein $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Singulett mit dem typischen Befund beim akuten Myokardinfarkt ist in Fig. 2 dargestellt. Die Konzentration von CCTD wird entsprechend der oben genannten Methode bestimmt. Die NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, z.B. durch Variation der Analytik und Auswertung, die Gesamtgruppe, eine Subgruppe oder Subspezies der CCTD zu bestimmen, während erfindungsgemäße immunologische oder biochemische Methoden häufig eine Subgruppe oder Subspezies der CCTD bestimmen. Weitere Ausführungsbeispiele des erfindungsgemäßen Verfahrens sind durch den Einsatz anderer CCTD-Bestimmungsmethoden als der NMR-Spektroskopie möglich. Bei erfindungsgemäßen biochemischen Methoden werden beispielsweise durch Hinzugabe von Reagenzien (z. B. Enzymen) chemische Reaktionsprodukte erzeugt, die dann die Detektion und Messung der Gesamtgruppe, einer Subgruppe oder Subspezies der CCTD ermöglichen. Eine solche Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann z. B. durch eine Modifikation der von Takayama publizierten Methode durchgeführt werden (Takayama, M. et al., 1977, Clin. Chim. Acta 79:93-98). Die Bestimmung von Cholin erfolgt dabei über eine Oxidation von Cholin mittels einer Cholinoxidase, wobei als Reaktionsprodukte Betain und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) anfallen. Die Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird durch eine Farbreaktion, z. B. durch eine Kopplung von 4-Aminoantiporin und Phenol in Anwesenheit einer Peroxidase, nachgewiesen, und die Konzentration wird durch

die Messung der Absorption bei 500 nm in einem kalibrierten UV-Spektrophotometer gegen die Blindprobe ermittelt.

Ein ähnliches, aber nicht-erfindungsgemäßes Verfahren kann auch für die Bestimmung der 5 Gesamtgruppe von Cholin-Phospholipiden eingesetzt werden, wobei bei Verwendung einer unspezifischen Phospholipase D ohne Vorschalten eines weiteren Trennverfahrens die Methode nicht die erfindungswesentlichen Merkmale aufweist, da auch die große Gruppe von nicht-erfindungsgemäßigen Diacyl-Phospholipiden mitgemessen wird. Die Spezifität der in der Analytik eingesetzten Phospholipase bzw. das Vorhandensein eines vorgeschalteten Trennverfahrens entscheidet über die Spezifität bzw. die Art der analysierten Substanzen. Wird eine 10 unspezifische Phospholipase D eingesetzt und kein weiteres Trennverfahren vorgeschaltet, dann wird die unspezifische Gesamtgruppe von Cholin-Phospholipiden gemessen, so daß die erfindungswesentlichen Merkmale des Verfahrens nicht erfüllt sind. Wird eine spezifische Phospholipase D oder eine spezifische Lysophospholipase D eingesetzt, mit einer Substratspezifität für die erfindungsgemäßigen Plasmencylcholine und/oder Lysoplasmenylcholine, 15 ist eine erfindungsgemäße Ausführung des Verfahrens möglich, da erfindungsgemäße Substanzen dann spezifisch gemessen werden. Die Anwendung dieser Plasmalogen-spezifischen Phospholipasen bzw. Lysophospholipasen für die Analytik von CCTD ist bisher nicht publiziert worden, insbesondere nicht in der erfindungsgemäßigen diagnostischen Anwendung bei 20 akuten koronaren Syndromen. Wird vor dem Einsatz von Phospholipasen die Probe speziell aufbereitet (z.B. durch chromatographische Trennverfahren, Filtration oder Anreicherungsverfahren), so daß nicht-erfindungsgemäße Phospholipide, insbesondere Diacyl-Phospholipide, die aus der Leber stammen, entfernt wurden, spielt die Substratspezifität der 25 verwendeten Phospholipase bzw. Lysophospholipase selbstverständlich keine so herausragende Rolle mehr, und die Spezifität des Verfahrens wird durch die vorgeschalteten Trennverfahren determiniert. Das Weglassen jeglicher Phospholipasen bzw. Lysophospholipasen führt im Ablauf der oben genannten Analytik zur Bestimmung von Cholin, was in der Anwendung bei der Diagnostik von akuten koronaren Syndromen ebenso eine erfindungsgemäße Durchführung des Verfahrens darstellt. Die Bestimmung von Cholin kann auch mit einer einfachen 30 Fällungsreaktion mit anschließender Photometrie durchgeführt werden, wobei in jedem Fall bei diesen einfachen Ausführungen die Spezifität der Methode für erfindungsgemäße Substanzen genau überprüft werden sollte. Bei der erfindungsgemäßigen biochemischen Bestimmung von Cholin oder anderen CCTD im Vollblut kann vor der quantitativen Bestimmung eine Hämolyse der Erythrozyten, z.B. durch Saponine durchgeführt werden.

Bei erfindungsgemäßen immunologischen Methoden werden beispielsweise durch den Einsatz von immunologischen Reagenzien (z. B. Antikörpern), in der Regel in Kombination mit weiteren chemischen und/oder immunologischen Reagenzien Reaktionen bzw. Reaktionsprodukte erzeugt, die dann die Detektion und Messung der Gesamtgruppe, einer Subgruppe oder 5 Subspezies der CCTD ermöglichen. Die Durchführung dieser erfindungsgemäßen immunologischen Methoden kann in Anlehnung an die von Smal und Baldo publizierte Methodik vorgenommen werden (Smal, M.A. et al 1991, Lipids 26:1130-1135; Baldo, B.A. et al 1991, Lipids 26; 1136-1139). Auf diese Veröffentlichungen wird Bezug genommen. Dabei wird für die Entwicklung eines erfindungsgemäßen immunologischen Testverfahrens im ersten Schritt 10 ein CCTD-Immungen hergestellt. Es werden synthetisierte oder hochgereinigte CCTD in stabile CCTD-Analoga überführt und an Proteine (z. B. methyliertes bovinus Serumalbumin) gebunden. Daraufhin werden Tiere (z. B. Hasen oder Schafe) mit dem CCTD-Protein-Konjugat immunisiert und die gebildeten Anti-CCTD-Antikörper isoliert und gereinigt, z. B. unter Verwendung einer Affinitätschromatographie. Die Spezifität der Antikörper für CCTD 15 und/oder eine Subgruppe oder Subspezies von CCTD sollte entsprechend überprüft werden. Die Anti-CCTD-Antikörper können schließlich mit verschiedenen immunologischen Techniken zur quantitativen Diagnostik eingesetzt werden.

Bei Verwendung eines Radioimmunoassays konkurrieren radioaktiv markierte Antigene (z. 20 B. ¹²⁵I-CCTD mit dem Antigen der Probe (CCTD der Probe) um eine im Unterschub vorliegende Menge Anti-CCTD-Antikörper im Testansatz. Die Verdrängung der radioaktiv markierten CCTD von Anti-CCTD-Antikörpern steht in einer quantitativen Beziehung zur CCTD-Konzentration in der Probe, welche nach Erstellung einer Standardkurve und z. B. nach Fällung von an Antikörper gebundenem radioaktivem CCTD bestimmt werden kann.

25 Nach einem ähnlichen Prinzip kann ein CCTD-Chemilumineszenz-Immunoassay (CCTD-CELIA) zur Bestimmung von CCTD durchgeführt werden. CCTD und Luminol-markiertes Antigen konkurrieren um eine limitierte Menge Festphase-gebundener Antikörper. Das meßbare Lichtsignal ist umgekehrt proportional zur CCTD-Konzentration in der Patientenprobe.

30 Des weiteren kann die immunologische Bestimmung von CCTD auch durch ein CCTD-Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay durchgeführt werden. Dabei konkurrieren eine definierte Menge Fluorophor markierter CCTD mit den CCTD der Probe um eine im Unterschub vorliegende Menge korrespondierender Anti-CCTD-Antikörper. Registriert wird die Beeinflussung der Fluorophor-markierten CCTD nach Antikörperbindung. Zur Messung angewen-

det wird die Technik der Fluoreszenz-Polarisation, bei der die Änderung des Winkels der polarisierten Fluoreszenzstrahlung, die das Fluorophor nach Anregung emittiert, gemessen wird. Liegen die Fluorophor-markierten CCTD an Antikörper gebunden vor, können sie sich wenig, in freier Form aber gut im Zeitraum zwischen Absorption und Emission von Strahlung drehen. Die Polarisation ist groß (Winkeländerung der emittierten Strahlung klein) bei niedriger CCTD-Konzentration und klein (Winkeländerung groß) bei hoher CCTD-Konzentration.

Die erfindungsgemäße immunologische Bestimmung von CCTD kann ebenfalls als Sandwich-Assay durchgeführt werden, wenn die zu bestimmenden CCTD, bzw. Subgruppen oder 10 Subspezies von CCTD mindestens zwei verschiedene Epitope aufweisen oder sich durch eine spezifische Reaktion in eine Substanz mit mindestens zwei verschiedenen Epitopen überführen lässt. In diesem Fall ist die Durchführung eines CCTD-enzyme linked immunoabsorbent assay (CCTD-ELISA) möglich. Der Anti-CCTD-Antikörper ist an eine feste Phase, z.B. eine Mikrotiterplattenvertiefung, magnetische Partikel, Plastikperlen oder an eine Röhrchenwand 15 gekoppelt. Wird die entsprechend vorbereitete Probe dazugegeben, binden CCTD der Probe an den Antikörper. Die Menge des gebundenen CCTD-Antigens wird durch die Zugabe eines markierten Zweitantikörpers ermittelt, der an das CCTD-Antigen unter Bildung eines Sandwich bindet. Je höher die Konzentration der gebundenen CCTD, desto größer ist die Menge des im Sandwich gebundenen, z.B. durch einen Enzym-markierten Zweitantikörper. Für einen 20 bestimmten CCTD-Konzentrationsbereich besteht eine lineare Beziehung zwischen der CCTD-Konzentration und der Enzymaktivität.

Ein ähnliches erfindungsgemäßes Bestimmungsverfahren ist das Microbead-enzymimmunoassay von CCTD (CCTD-MEIA), bei dem der Anti-CCTD-Antikörper an Mikroperlchen gebunden ist. In einem ersten Schritt wird die Probe mit den Antikörper-Mikroperlchen inkubiert, dann wird eine alkalische Phosphatase(AP)-markierter Zweitantikörper hinzugegeben. Es kommt zur Ausbildung eines Sandwich am Mikroperlchen. In einem weiteren Schritt wird ein Teil des Reaktionsgemisches auf eine Glasfasermatrix pipettiert, die eine hohe Affinität zu den Mikroperlchen hat und diese bindet. Nach Waschen der Glasfasermatrix mit Substratlösung und Entfernung von nicht gebundenem AP-markiertem Zweitantikörper kann die als Sandwich an den Mikroperlchen gebundene AP z.B. vom Substrat Methylumbelliferylphosphat die Phosphatgruppe abspalten. Die Fluoreszenz des gebildeten Methylumbelliferon wird im Auflicht bei 448 nm gemessen. Die Sandwich-Techniken sind für kleine Moleküle mit nur einem Epitop ungeeignet und lassen sich nur bei CCTD anwenden, die ausgewählt sind aus der Gruppe von CCTD mit mindestens zwei Epitopen bzw. den

CCTD, die sich durch eine spezifische chemische Reaktion in analoge Moleküle mit mindestens 2 Epitopen überführen lassen.

5 Weitere Varianten und Spezifikationen immunologischer CCTD-Bestimmung können durchgeführt werden. Dazu zählen direkte immunologische Antigen-Bestimmungen, Bestimmungen als lösliche Immunkomplexe, indirekte Antigen-Bestimmungen, weitere Antigen- bzw. Antikörperbestimmungen durch Markierung eines Reaktionspartners, Liganden-Bindungsassays und weitere heterogene und homogene Immunoassays. Im Rahmen der immunologischen CCTD-Bestimmung können Trenntechniken wie Adsorption, Fällung, Immunkällung und/oder das Festphasenprinzip angewendet werden sowie verschiedene Markierungstechniken, wie radioaktiver Label (z.B. ^{125}I), enzymatischer Label (z.B. alkalische Phosphatase, Meerrettichperoxidase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase), Fluoreszenz-Label oder Lumineszenz-Label (z.B. Chemilumineszenz, Biolumineszenz) angewendet werden. Entscheidendes Kriterium ist die spezifische Bestimmung von CCTD bzw. einer Subgruppe oder

10 15 Subspezies von CCTD oder den genannten Reaktionsprodukten und die Anwendung zur Diagnostik akuter koronarer Syndrome.

Bei erfindungsgemäßen chromatographischen Methoden zur Bestimmung von CCTD wird beispielsweise, nach Vorbereitung der Probe, eine Stofftrennung durch die Verteilung zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase mit entsprechenden qualitativen und quantitativen Aussagen zu CCTD durchgeführt. Die erfindungsgemäße Bestimmung von CCTD kann dabei in Anlehnung an die Methode von Brouwers durchgeführt werden (Brouwers, J.F.H. et al., 1998, J Lipid Res 39: 344-353). Nach Präparation der Probe und Lipidextraktion werden zunächst Phosphatidylcholine von anderen Lipiden getrennt. Dies kann mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (HPLC) z.B. als Normalphasen-HPLC (NP-HPLC) durchgeführt werden. Nach entsprechender Trennung und Sammlung der Eluate wird eine Reverse-Phase Chromatographie (RP-HPLC) beispielsweise mit Acetonitril, Methanol, und Triethylamin als Lösungsmittel durchgeführt. Als Detektorsystem eignet sich eine Light-Scattering-Detection. Durch die Untersuchung von Standardlösungen in Kombination mit Phosphorbestimmungen können Kalibrationskurven erstellt werden, so daß eine quantitative Bestimmung von CCTD und insbesondere auch die Bestimmung von bestimmten CCTD-Subspezies möglich ist.

35 Die chromatographischen und immunologischen Bestimmungsmethoden haben dabei im Vergleich mit der NMR-Methode den Vorteil, z.B. eine bestimmte Plasmencylcholin-Subspezies,

mit einer definierten Alkenyl-Gruppe in der sn-1 Position und einer bestimmten Acyl-Gruppe in der sn-2 Position spezifisch zu bestimmen, bzw. von anderen ähnlichen Molekülen zu unterscheiden und damit die Organ-Spezifität des Verfahrens zu erhöhen.

5 Für den Fachmann ist es offensichtlich, daß zu den oben genannten Methoden ähnliche Bestimmungsverfahren für die erfindungsgemäße Bestimmung von CCTD-Reaktionsprodukten ebenso eingesetzt werden können.

Für die erfindungsgemäße Bestimmung von CCTD-Subspezies eignen sich besonders die 10 Moleküle, bei denen die Anzahl falsch positiver Testergebnisse bei der Diagnostik akuter koronarer Syndrome gering bleibt. Unter anderen Subspezies sind dabei folgende CCTD-Subspezies einschließlich ihrer Reaktionsprodukte bedeutsam und können einzeln oder in beliebiger Kombination für die erfindungsgemäße Durchführung des Verfahrens bestimmt werden: 16:0-20:3 Plasmenylcholin, 16:0-18:3 Plasmenylcholin, 17:0-18:2 Plasmenylcholin, 15:0-18:2 Plasmenylcholin, 17:0-18:1 Plasmenylcholin, 17:0-18:3 Plasmenylcholin, 16:0-17:1 Plasmenylcholin, 14:0-18:2 Plasmenylcholin, 15:0-18:1 Plasmenylcholin, 16:0 Lysoplasmenylcholin, 17:0 Lysoplasmenylcholin, 15:0 Lysoplasmenylcholin, 14:0 Lysoplasmenylcholin und die Reaktionsprodukte 16:0(Alk-1-enyl)-20:3 Glycerol, 16:0(Alk-1-enyl)-18:3 Glycerol, 17:0(Alk-1-enyl)-18:2 Glycerol, 15:0(Alk-1-enyl)-18:2 Glycerol, 17:0(Alk-1-enyl)-18:1 Glycerol, 17:0(Alk-1-enyl)-18:3 Glycerol, 16:0(Alk-1-enyl)-17:1 Glycerol, 14:0(Alk-1-enyl)-18:2 Glycerol, 15:0(Alk-1-enyl)-18:1 Glycerol, 16:0(Alk-1-enyl)-20:3 Glycerolphosphat, 16:0(Alk-1-enyl)-18:3 Glycerolphosphat, 17:0(Alk-1-enyl)-18:2 Glycerolphosphat, 15:0(Alk-1-enyl)-18:2 Glycerolphosphat, 17:0(Alk-1-enyl)-18:1 Glycerolphosphat, 17:0(Alk-1-enyl)-18:3 Glycerolphosphat, 16:0(Alk-1-enyl)-17:1 Glycerolphosphat, 14:0(Alk-1-enyl)-18:2 Glycerolphosphat und 15:0(Alk-1-enyl)-18:1 Glycerolphosphat. Weitere CCTD-Subspezies und Reaktionsprodukte können für das erfindungsgemäße Verfahren ausgewählt werden, sofern mit deren Bestimmung die erfindungsgemäßen Merkmale erfüllt werden.

Bei Durchführung des Verfahrens mit der NMR-Spektroskopie können neben der Analyse 30 von $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Singuletts auch andere Molekülanteile in die Analyse einbezogen werden. Des Weiteren kann die NMR-Spektroskopie als ein-, zwei- oder mehrdimensionale NMR-Spektroskopie oder mit anderen NMR-spektroskopischen Untersuchungstechniken u.a. auch in Kopplung z.B. an chromatographische Verfahren (beispielsweise als LC-NMR) durchgeführt werden.

Die Gemeinsamkeit der verschiedenen möglichen erfindungsgemäßen Bestimmungsmethoden und Techniken liegt darin, daß die Spezifität der Methode für CCTD hoch ist, so daß die erfindungswesentlichen Merkmale der Frühdiagnostik akuter koronarer Syndrome erfüllt sind. Für die selektive Bestimmung kardial freigesetzter CCTD mit einem erfindungsgemäßen Verfahren können dabei bestimmte Schritte der Probenvorbereitung wichtig sein. So werden beispielsweise in der beschriebenen Methodik durch die präanalytische Ultrafiltration nicht-erfindungsgemäße, Protein-gebundene hepatische Diacyl-Cholinphospholipide in der Menge reduziert bzw. je nach Filter auch vollständig eliminiert, während die freie lösliche Fraktion kardial freigesetzter CCTD einschließlich der Plasmalogene im Ultrafiltrat gemessen wird.

10 Andere methodische Schritte der Reinigung und/oder Extraktion oder biochemischen Modifikation können angewendet werden und zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Des Weiteren kann das erfindungsgemäße Verfahren so durchgeführt werden, daß eine, mehrere oder alle molekularen Subspezies von kardial freigesetzten CCTD bzw ihren Reaktionsprodukten analysiert werden.

15

Neben der Bestimmung von CCTD bietet die ¹H-NMR-Spektroskopie die Möglichkeit, in demselben Untersuchungsgang weitere Metabolite, wie Creatin (Singulett bei 3,93 ppm) und Dimethylamin (Singulett bei 2,727 ppm), zu bestimmen, die ebenfalls für die Infarktdiagnostik von Bedeutung sind. Die Kombination der Auswertung mehrerer Metabolite in einem Untersuchungsgang (z.B. CCTD, Creatin und Dimethylamin) wird hier als Pattern-Recognition (Muster-Erkennung) bezeichnet. Gegenüber der isolierten Konzentrationsbestimmung von CCTD verbessert die Auswertung im Pattern-Recognition Modus die diagnostische Aussagekraft der Methode für die Erkennung akuter koronarer Syndrome.

25 Bewertung der Meßergebnisse von CCTD

Die Bewertung der Meßergebnisse wird unter Berücksichtigung eines Grenzwertes vorgenommen. Der Grenzwert ist abhängig von der untersuchten Körperflüssigkeit und der gewählten Bestimmungsmethode und muß durch entsprechende Untersuchungen festgelegt werden. Liegt der bestimmte Meßwert für CCTD höher als der Grenzwert, liegt ein akuter Myokardinfarkt vor. Wenn der Meßwert niedriger als der Grenzwert ist, kann ein akuter Myokardinfarkt nahezu ausgeschlossen werden. Analoges gilt für die Diagnose der instabilen Angina pectoris, wobei die Grenzwerte durch die Untersuchung einer ausreichenden Anzahl von Patienten und in Hinblick auf die diagnostische Fragestellung festgestellt werden müssen. In der von uns durchgeführten Methodik der Konzentrationsbestimmung von CCTD liegt der

Grenzwert je nach Auswertungsmodus zwischen 15-40 $\mu\text{mol/l}$. Die dargestellten klinischen Daten beziehen sich auf eine Auswertung mit einem Grenzwert von 22 $\mu\text{mol/l}$. Dabei muß der Grenzwert, wie bereits erwähnt, im einzelnen für die gewählte analytische Methodik, den Auswertungsmodus und die genaue Fragestellung bestimmt werden und kann z.B. bei der 5 immunologischen oder chromatographischen Bestimmung von CCTD-Subspezies auch in einem anderen Meßbereich, z.B. im nanomolaren oder subnanomolaren Bereich liegen. Bei der Durchführung der ^1H -NMR-Spektroskopie kann zusätzlich zur isolierten Konzentrationsbestimmung von CCTD eine Auswertung im Pattern-Recognition-Modus vorgenommen werden (z.B. zusätzliche Bestimmung von Creatin und Dimethylamin). Bei der Auswertung 10 im Pattern-Recognition-Modus wurde die Erhöhung von CCTD oder Creatin bei gleichzeitig normalen Konzentrationen von Dimethylamin für die Diagnose eines AMI herangezogen.

Befunde bei Patienten

15 Insgesamt wurden 20 Patienten und Probanden (8 f, 12 m) im Alter von 22-68 Jahren, teilweise periodisch, mit insgesamt 44 Proben untersucht. Weitere Proben wurden mit speziellen Fragestellungen untersucht. 10 Patienten hatten einen akuten Myokardinfarkt (4 Vorderwandinfarkte; 6 Hinterwandinfarkte). Die Proben wurden in verschiedenen Intervallen 1 h - 35 h nach Schmerzbeginn abgenommen. 60 % der Proben wurden in den ersten 6 Stunden 20 nach Schmerzbeginn abgenommen. Alle Patienten mit AMI wurden koronarangiographiert (9 Pat. akut und 1 Pat. im Verlauf). Bei 9 Patienten mit AMI wurden eine Reperfusionstherapie, d.h. Thrombolyse, primäre perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA), Thrombolyse mit Rescue-PTCA oder akute aorto-koronare Venen-Bypass-Operation (ACVB-OP) durchgeführt. Bei einer Patientin zeigte sich in der akut durchgeführten Koronarangiographie 25 ein spontane Rekanalisation im Infarktgefäß und ein Restthrombus mit gutem poststenotischen Fluß, so daß keine Primär-PTCA mehr durchgeführt wurde. In der Vergleichsgruppe wurde ein Patient mit heftigen akuten Thoraxschmerzen akut koronarangiographiert, wobei eine koronare Herzerkrankung ausgeschlossen werden konnte. In der Vergleichsgruppe bestanden verschiedene Erkrankungen wie instabile Angina pectoris, stabile Angina pectoris, 30 Skelettmuskeltrauma, Myopathie, Z.n. Lungenembolie, Pleuritis und Niereninsuffizienz. Bei den Patienten mit akutem Myokardinfarkt zeigte sich ein typisches Muster an Komplikationen wie Linksherzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen. Ein Patient mit einem Vorderwandinfarkt kam in einen reanimationspflichtigen kardiogenen Schock, den er aber nach Thrombolyse, Akut-PTCA mit Stent-Implantation und intraaortalen Ballonpumpen- (IABP)-Implantation 35 überlebte.

In allen Proben wurden eine Konzentrationsbestimmung von CCTD durchgeführt.

Die Bewertung der Meßergebnisse von CCTD erfolgte unter Berücksichtigung des ermittelten

5 Grenzwertes. Wie bereits ausgeführt, zeigen Meßwerte oberhalb des Grenzwertes einen akuten Myokardinfarkt an; bei Meßwerten unterhalb des Grenzwertes liegt dagegen kein akuter Myokardinfarkt vor. Die Bestimmung der diagnostischen Wertigkeit wurde Proben-bezogen durchgeführt, d.h. die Bewertung des einzelnen Meßergebnisses wurde unabhängig von früheren oder späteren Meßergebnissen des Patienten vorgenommen. Bei 29 der 30 Infarkt-Proben
10 waren die CCTD über den Grenzwert erhöht. Umgekehrt waren mit Ausnahme einer Probe die CCTD bei allen Patienten ohne Infarkt niedriger als der Grenzwert. Fig. 3 zeigt die Daten zur diagnostischen Wertigkeit von CCTD für die Diagnose eines akuten Myokardinfarktes für den Gesamtzeitraum von 0-35 h. Fig. 3 zeigt, daß CCTD mit 96.6 % die höchste Sensitivität und mit 95.4 % die höchste diagnostische Effizienz im Vergleich zu allen anderen Infarkt-
15 Markern haben. Die hohe diagnostische Wertigkeit von CCTD ist auch deshalb bemerkenswert, weil viele diagnostisch schwierige Patienten untersucht wurden, d.h. Patienten mit Mikro-Infarkten (4 von 10 Patienten), Patienten in den ersten Stunden des Infarktes und Patienten mit Skelettmuskeltrauma.

20 CCTD waren in ihrer diagnostischen Wertigkeit insbesondere in der Frühphase des AMI den konventionellen Infarkt-Markern überlegen. Alle Infarkt-Patienten in der Zeitspanne 0 bis 6 Stunden nach Schmerzbeginn waren CCTD-positiv, während nur 37.5 % der Patienten-Proben eine pathologische CK oder CK-MB hatten (siehe Fig. 4). Myoglobin hatte entsprechend seiner raschen Freisetzungskinetik die zweithöchste Sensitivität mit 62.5 %, ist aber,
25 wie bekannt, nicht myokardspezifisch. In den ersten 6 h wiesen nur 50 % der Proben der Patienten mit AMI eine pathologische Troponin I/T-Konzentration auf.

Die Vorteile von CCTD kommen noch deutlicher zur Darstellung, wenn man lediglich Patienten-Proben in den Stunden 0-3 nach Schmerzbeginn betrachtet (Fig. 5). Während die konventionellen Infarkt-Marker in den ersten drei Stunden nach Schmerzbeginn kaum eine diagnostische Aussagekraft besitzen und eine diagnostische Effizienz zwischen 50% und 71% haben sind, erkennen CCTD alle untersuchten Infarkt-Proben in den ersten 3 h nach Schmerzbeginn. Weitere Untersuchungsergebnisse der Anmelder bestätigen die rasche Freisetzung von CCTD bei akuten koronaren Syndromen und ihre hohe diagnostische Aussagekraft in der Frühphase nach Beginn der Symptomatik. In der Spätphase des AMI kommt es zu
35 einer geringen Verminderung der Sensitivität von CCTD.

Fig. 6 zeigt die diagnostische Wertigkeit von CCTD in der Spätphase des AMI. In der Spätphase des AMI lag die Sensitivität von CCTD bei 91.6 %. Bei einer Probe kam es zu einem falsch-negativen Test-Ergebnis.

5 Eine Erhöhung von CCTD war zu 92.8 % spezifisch für einen akuten Myokardinfarkt. Bei einer Probe bestand ebenfalls eine Erhöhung von CCTD, ohne daß eine akute Myokardinfarkt vorlag.

Die Auswertung von ¹H-NMR-Spektren im Pattern-Recognition-Modus (gleichzeitige Bestimmung von CCTD, ihren Reaktionsprodukten, Creatin und Dimethylamin, sowie von beliebigen geeigneten Kombinationen davon) verbesserte die diagnostische Aussagekraft der Methode, so daß bei den bisher durchgeföhrten Untersuchungen alle Myokardinfarkte mit 100 % Sensitivität und 100 % Spezifität zu jedem Zeitpunkt diagnostiziert bzw. ausgeschlossen werden konnten.

15 Patienten mit instabiler Angina pectoris haben bekanntermaßen eine schlechtere Prognose, wenn im Verlauf erhöhte Werte kardialer Troponine festgestellt werden (Ohman E.M. 1996, N Engl J Med 335: 1333-41). Man nimmt an, daß diese Patienten nicht nur eine Myokardischämie durchmachen, sondern auch myokardiale Mikronekrosen erleiden, so daß nicht auszuschließen ist, daß diese Patienten in Zukunft bei neuen Klassifikationen des AMI als Mikroinfarkte klassifiziert werden. Die rasche Identifizierung solcher Patienten ist wichtig, da sie in der Regel ohne Zeitverzug therapiert werden sollten und gegebenenfalls notfallmäßig angiographiert werden müssen. Die Untersuchungen der Anmelder zeigten, daß die Patienten mit Angina pectoris und unkomplizierterem Verlauf keine erhöhten CCTD haben, hingegen alle 20 Patienten mit myokardialen Mikronekrosen erhöhte CCTD-Werte aufweisen. Nach den bisherigen Ergebnissen entwickeln alle Patienten mit akuten koronaren Syndromen, die CCTD-positiv sind, im Verlauf erhöhte Troponin-Werte. Die seriellen Untersuchungen zeigten ebenfalls, daß bei Patienten mit Mikronekrosen die CCTD um mehrere Stunden früher positiv waren als Troponin I oder Troponin T. Des weiteren ist davon auszugehen, daß das Verfahren 25 ebenfalls hilfreich bei der Diagnostik schwerer myokardialer Ischämien, z.B. bei Katheterinterventionen an den Koronarien, oder bei Erkrankungen mit Beteiligung des Myokards, z.B. bei Myokarditiden, ist. Die Ergebnisse der Anmelder belegen, daß das Verfahren sowohl beim akuten Myokardinfarkt als auch bei der instabilen Angina pectoris, d.h. allgemein bei 30 Verdacht auf ein akutes koronares Syndrom, wertvoll ist.

Da freigesetzte CCTD durch verschiedene biochemische Prozesse weiter metabolisiert bzw. modifiziert werden, entstehen neben Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten auch vermehrt Reaktionsprodukte von CCTD. Diese Reaktionsprodukte können Bruchstücke oder bestimmte Metabolite von CCTD darstellen. Wie z.B. von den CK-Iso-5
enzymen bekannt, kann die gleichzeitige Bestimmung solcher Reaktionsprodukte von Infarkt-
Markern diagnostisch vorteilhaft sein. Die Untersuchungen der Anmelder zeigten bei einem
Teil der Infarkt-Patienten Hinweise auf die Entstehung solcher Reaktionsprodukte von
CCTD. Die Entstehung der Reaktionsprodukte geht u.a. auf die gesteigerte Aktivität be-10
stimmter Phospholipasen zurück. Neben der Phospholipase A₂, die u.a. zur Freisetzung von
dem genannten Lysoplasmenylcholin beiträgt, sind, wie anfangs erwähnt, weitere wichtige
Enzyme dieser Gruppe die Phospholipasen C und D. Reaktionsprodukte der Aktivität dieser
beiden Phospholipasen in Einwirkung auf die Plasmalogene sind z.B. 1-O-Alk-1'-enyl-2-15
substituiertes Glycerol (durch Phospholipase C) bzw. 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Gly-
cerolphosphat (durch Phospholipase D). Diese Reaktionsprodukte werden gemeinsam mit
Cholin bzw. Phosphorylcholin vermehrt gebildet, wenn bei Myokardischämie die genannten
Phospholipasen auf Plasmenylcholine einwirken. Das Verfahren ist also auch durch den
Nachweis der genannten einfachen Reaktionsprodukte von CCTD, gegebenenfalls in Kombi-20
nation mit CCTD-Bestimmungen möglich.

20 Zeitverlauf der Freisetzung von CCTD beim akuten Myokardinfarkt

Die Analyse aller verfügbaren Meßwerte für CCTD (mit Ausschluß einer nicht-repräsentativen Probe) zeigte, daß CCTD innerhalb von 60 min nach Schmerzbeginn positiv werden und offenbar eine biphasische Freisetzungskinetik mit einem frühen Maximum nach 2-3-h und 25 einem zweiten Maximum nach 5-6 h haben. Der Vergleich mit anderen Infarkt-Markern zeigte, daß die Freisetzungskinetik von CCTD entsprechend dem niedrigen Molekulargewicht erheblich schneller ist als die Freisetzung von den bisher bekannten Markern, was die hohe diagnostische Wertigkeit in der Frühphase erklärt.

Weitere von den Anmeldern durchgeführte Untersuchungen bei über 100 Patienten mit Brust-30 schmerzen konnten die Überlegenheit des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber konven-
tionellen Markern sowie die erfindungsgemäßen Eigenschaften für die Frühdiagnostik von
akuten koronaren Syndromen bestätigen.

Das Verfahren zur Erkennung des akuten Myokardinfarktes und schwerer Formen der in-35
stabilen Angina pectoris durch die Bestimmung und Bewertung des Gehaltes von Cholin,
Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phos-

phorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, und deren einfachen Reaktionsprodukten in Körperflüssigkeiten scheint allen bisher eingeführten nicht-invasiven Verfahren, einschließlich der Bestimmung bekannter biochemischer Marker zur Diagnostik akuter koronarer Syndrome, überlegen zu sein. Neben dem akuten Myokardinfarkt können 5 ebenfalls schwere Formen der instabilen Angina pectoris mit myozytären Nekrosen, welche im Verlauf erhöhte Troponin-Werte aufweisen, durch das Verfahren frühzeitiger erkannt werden. Diese Ergebnisse belegen, daß das Verfahren sowohl beim akuten Myokardinfarkt als auch bei der instabilen Angina pectoris, d.h. allgemein bei Verdacht auf ein akutes koronares Syndrom, wertvoll ist. Der besondere Wert der Erfindung wird auch dadurch unterstrichen, 10 daß es mit dem erfindungsgemäßen in vitro Verfahren erstmals möglich sein wird, Patienten mit akuten koronaren Syndromen und akutem Myokardinfarkt frühzeitig, d.h. in den ersten drei Stunden nach Schmerzbeginn, sicher zu diagnostizieren bzw. eine Ausschlußdiagnose zu stellen. Dies ist durch kein publiziertes in vitro Verfahren mit einer vergleichbaren hohen Sicherheit möglich. Die American Heart Association und das American College of Cardiology 15 stellen fest, daß es einen „eindeutigen Bedarf für bessere Methoden zur prompten Identifikation von Patienten mit akutem Myokardinfarkt gibt, die so genau und so früh wie möglich anwendbar sein müssen“ (übersetzt aus Ryan, T.J. et al. ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients with Acute Myocardial Infarction, 1996, J Am Coll Cardiol 28: 1328-1428, S. 1340). Eine solche Methode gibt es zur Zeit nicht, und nach den Anmeldern vorliegenden Daten erfüllt das erfindungsgemäße Verfahren genau die geforderten Eigenschaften. 20

Das Verfahren bezieht sich auf die Diagnostik der klar definierten Krankheitsbilder akuter koronarer Syndrome, die die instabile Angina pectoris und den akuten Myokardinfarkt umfassen, der als Q-wave- oder als non-Q-wave Myokardinfarkt verlaufen kann. Untersuchungen zu anderen Krankheitsbildern, wie z.B. dem Hirninfarkt, die hinsichtlich ihrer Pathomorphologie und Pathobiochemie in vielerlei Hinsicht unterschiedlich sind, erlauben keine Analogieschlüsse in Bezug auf das erfindungsgemäße Verfahren. 25

30 Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Frühdiagnostik akuter koronarer Syndrome ist mit verschiedenen Bestimmungsmethoden bzw. Techniken möglich, zumal gleichwertige Meßergebnisse bestimmter Substanzen häufig mit unterschiedlichen Meßmethoden zu erheben sind, die im Fall von CCTD vielfältig in der Literatur beschrieben worden sind. Das Verfahren umfaßt neben der Auswahl *einer* geeigneten Meßmethode, die Auswahl 35 *einer* geeigneten Körperflüssigkeit, die verfahrens- und methodengerechte Proben-

vorbereitung, die spezifische Messung des Gehaltes von CCTD und/oder deren Reaktionsprodukten, ausgewählt aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt, und die verfahrensgerechte Auswertung zur Diagnostik von Patienten mit akuten koronaren Syndromen. Da die Freisetzung von CCTD in verschiedene andere Körperflüssigkeiten und Körperbestandteile erfolgt, ist die Anwendung des Verfahrens auch bei der Untersuchung anderer Körperbestandteile, z.B. Gewebeproben, möglich. Dabei ist allerdings die diagnostische Wertigkeit im Vergleich zu dem beschriebenen Anwendungsbeispiel möglicherweise vermindert. Da im Rahmen der Freisetzung von CCTD auch vermehrt Reaktionsprodukte der CCTD, ausgewählt aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt, anfallen, ist das Verfahren somit auch durch den Nachweis solcher Reaktionsprodukte möglich. Des weiteren ist es möglich, daß das Verfahren so durchgeführt wird, daß semi-quantitative oder qualitative Aussagen getroffen werden, d.h. daß z.B. Schnell-Tests für CCTD durch eine Farbreaktion lediglich anzeigen, ob ein Myokardinfarkt vorliegt oder nicht. Das Verfahren kann so durchgeführt werden, daß Zustände oder Vorgänge beobachtet oder hervorgerufen werden, die durch den Gehalt von CCTD oder CCTD-Reaktionsprodukten determiniert werden. Neben der Erkennung von akuten koronaren Syndromen bietet das Verfahren Aussicht auf weitere diagnostische Informationen wie Infarktgröße, Prognose, Therapiekontrolle und der Vorhersage bestimmter Komplikationen, Risiken und des klinischen Verlaufs. Der besondere Wert des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dadurch hervorgehoben, daß es die diagnostischen Eigenschaften aufweist, die von internationalen Expertenkommissionen, wie der American Heart Association und dem American College of Cardiology für in vitro Verfahren zur Frühdiagnostik von akuten koronaren Syndromen seit langem gefordert werden.

25

Insgesamt soll das Verfahren helfen, die erheblichen Probleme der derzeitigen Frühdiagnostik akuter koronarer Syndrome zu vermindern und die Diagnostik und Therapie der erkrankten Patienten zu verbessern.

30

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen und der Zeichnung offenbarten Merkmale können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung von Bedeutung sein.

5

10

Patentansprüche

15

1. In vitro Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, in Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen bestimmt wird.
2. In vitro Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, unter Berücksichtigung eines Grenzwertes bewertet wird.
3. In vitro Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, dadurch gekennzeichnet, daß der Gehalt von Reaktionsprodukten von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, in Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen bestimmt wird, wobei die Reaktionsprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt.
4. In vitro Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, dadurch gekennzeichnet, daß in Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen ein Zustand oder Vorgang beobachtet wird, der durch den Gehalt von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe,

die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, und/oder ihren Reaktionsprodukten, ausgewählt aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt, bestimmt wird.

5 5. In vitro Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, dadurch gekennzeichnet, daß quantitative, semi-quantitative oder qualitative Beobachtungen gemacht werden, die durch den Gehalt von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, und/oder ihren Reaktionsprodukten, ausgewählt aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt, in Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen bestimmt werden.

10 6. In vitro Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bestimmung von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, und/oder ihren Reaktionsprodukten, ausgewählt aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt, Kernspinresonanz(NMR)-Methoden, biochemische, enzymatische, immunologische, klinisch-chemische, chromatographische, massenspektrometrische, elektrochemische, photometrische Methoden eingesetzt werden.

15 7. In vitro Verfahren zur Erkennung und Diagnostik akuter koronarer Syndrome, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, dadurch gekennzeichnet, daß eine NMR-Spektroskopie von Körperflüssigkeiten oder Körperbestandteilen durchgeführt wird und die Auswertung durch eine „Mustererkennung“ (Pattern-Recognition) mehrerer Substanzen, insbesondere von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, von den Reaktionsprodukten, ausgewählt aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt, und von Creatin und Dimethylamin vorgenommen wird.

20 8. In vitro Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Bestimmung von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin

25 30 35

umfaßt, und/oder ihren Reaktionsprodukten, ausgewählt aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt, vorgenommen wird in einer Körperflüssigkeit, die ausgewählt ist aus einer Gruppe, die Serum, Plasma, Vollblut, aufbereitete Blutproben und Harn umfaßt.

5

9. Mittel zur Verwendung bei der Diagnose und/oder Analyse von akuten koronaren Syndromen, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, geeignet für ein Verfahren gemäß den Ansprüchen 1-8.
10. Testkit zur Diagnose und/oder Analyse von akuten koronaren Syndromen, insbesondere des akuten Myokardinfarktes, dadurch gekennzeichnet, daß er Mittel zum Aufnehmen einer Körperflüssigkeit oder eines Körperbestandteils und Mittel zum Nachweisen von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, und/oder ihren Reaktionsprodukten, ausgewählt aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt, in der Körperflüssigkeit oder dem Körperbestandteil aufweist.
11. Testkit nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet daß die Mittel zum Nachweisen anzeigen, wenn ein Grenzwert für den Gehalt von Cholin, Cholin- und/oder Trimethylammonium-Derivaten, ausgewählt aus der Gruppe, die Phosphorylcholin, Plasmalogene und Lysoplasmenylcholin umfaßt, bzw. ihren Reaktionsprodukten, ausgewählt aus der Gruppe, die 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerol und 1-O-Alk-1'-enyl-2-substituiertes Glycerolphosphat umfaßt, in der Körperflüssigkeit oder dem Körperbestandteil überschritten ist.

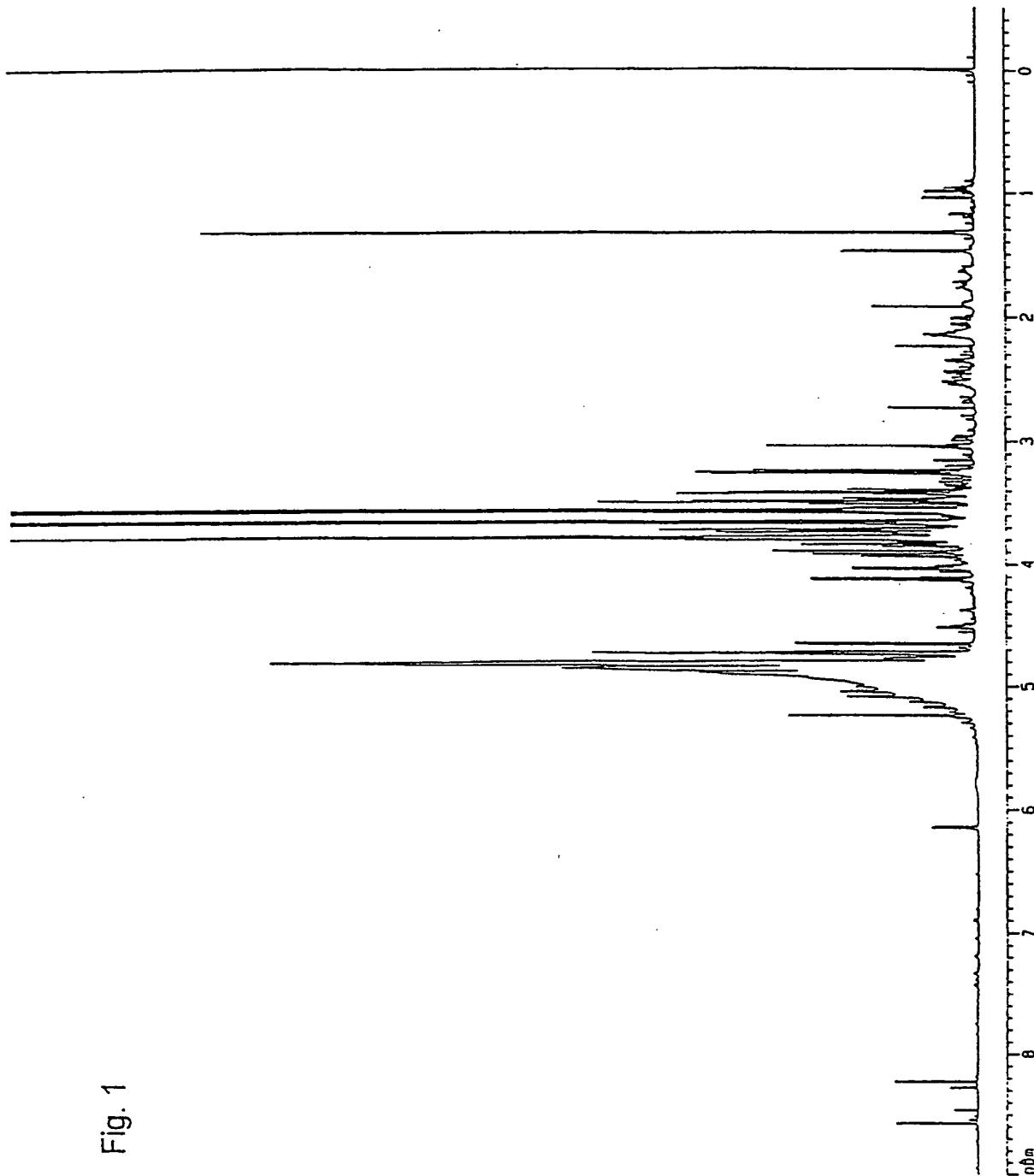
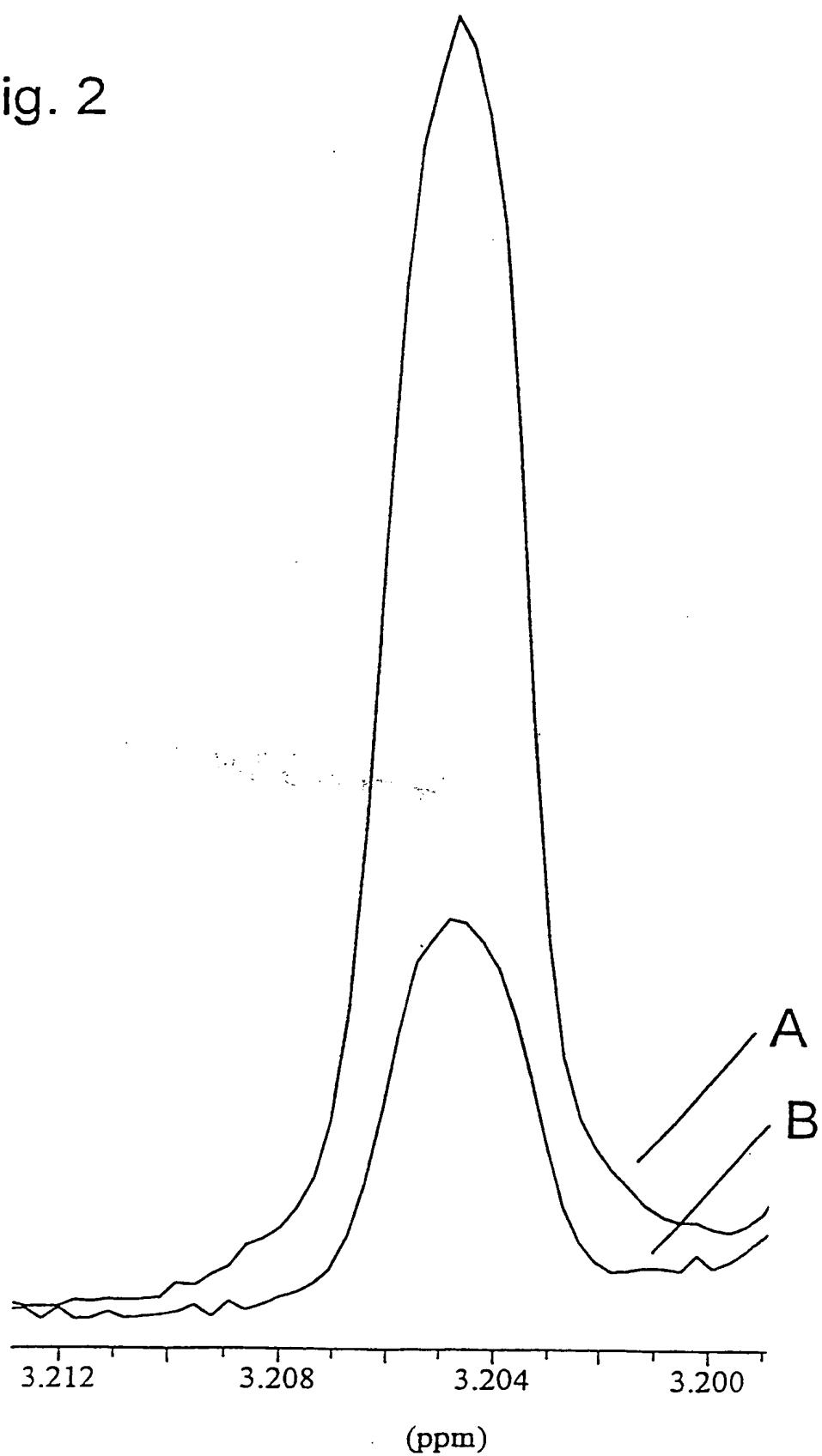


Fig. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gesamtzeitraum (0-35h)	CCTD ($> 22 \mu\text{mol/l}$)	CK ($> 100 \text{ U/l}$)	CK-MB ($\geq 6\%$ der CK)	Myo ($> 90 \text{ ng/ml}$)	cTnI/T ($c\text{TnI} > 1,5 \mu\text{g/l}$)
Sensitivität	96.6 %	57.1 %	57.1 %	60.7 %	69.5 %
Spezifität	92.8 %	71.4 %	100 %	64.2 %	92.8 %
positiver prädiktiver Wert	96.6 %	80.0 %	100 %	77.2 %	94.7 %
negativer prädiktiver Wert	92.8 %	45.4 %	53.8 %	45.0 %	52.0 %
diagnostische Effizienz	95.4 %	61.9 %	71.4 %	61.9 %	70.4 %

Fig. 3: Diagnostische Wertigkeit von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten (CCTD) im Vergleich zu anderen Infarkt-Markern im Gesamtzeitraum (0-35 h)
Probenanzahl (n) Infarktgruppe: CCTD n=30, CK/CK-MB/Myoglobin (Myo) n=28, TroponinI/T (cTnI/T) n=23; Vergleichsgruppe: alle Marker n=14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Frühphase des AMI (0-6 h)	CCTD (> 22 µmol/l)	CK (> 100 U/l)	CK-MB (≥ 6% der CK)	Myo (> 90 ng/ml)	cTnI/T (cTnI > 15 µg/l)
Sensitivität	100 %	37.5 %	37.5 %	62.5 %	50.0 %
Spezifität	92.8 %	71.4 %	100 %	64.2 %	92.8 %
positiv prädiktiver Wert	94.7 %	60.0 %	100 %	66.6 %	87.5 %
negativer prädiktiver Wert	100 %	50.0 %	58.3 %	60.0 %	65.0 %
diagnostische Effizienz	96.8 %	53.3 %	66.6 %	63.3 %	71.4 %

Fig. 4: Diagnostische Wertigkeit von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten (CCTD) im Vergleich zu anderen Infarkt-Markern in der Frühphase des AMI (0-6 h)
 Probenanzahl (n) Infarktgruppe: CCTD n=18, CK/CK-MB/Myoglobin (Myo) n=16, Troponin I/T (cTnI/T) n=14; Vergleichsgruppe: alle Marker n=14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Frühphase des AMI (0-3 h)	CCTD (> 22 μ mol/l)	CK (> 100 U/l)	CK-MB ($\geq 6\%$ der CK)	Myo (> 90 ng/ml)	cTnI/T (cTn> 1.5 μ g/l)
Sensitivität	100 %	12.5 %	12.5 %	50.0 %	28.5 %
Spezifität	92.8 %	71.4 %	100 %	64.2 %	92.8 %
positiver prädiktiver Wert	88.8 %	20.0 %	100 %	44.4 %	66.6 %
negativer prädiktiver Wert	100 %	58.8 %	66.6 %	69.2 %	72.2 %
diagnostische Effizienz	95.4 %	50.0 %	68.1 %	59.0 %	71.4 %

Fig 5: Diagnostische Wertigkeit von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten (CCTD) im Vergleich zu anderen Infarkt-Markern in der Frühphase des AMI (0-3 h)
 Probenanzahl (n) Infarktgruppe: CCTD n=8, CK/CK-MB/Myoglobin (Myo) n=8, Troponin I/T (cTnI/T) n=7, Vergleichsgruppe: alle Marker n=14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Spätphase des AMI (7-35 h)	CCTD (> 22 µmol/l)	CK (> 100 U/l)	CK-MB (≥ 6% der CK)	Myo (> 90 ng/ml)	cTnI/T (cTnI > 1,5 µg/l)
Sensitivität	91.6 %	83.3 %	83.3 %	58.3 %	100 %
Spezifität	92.8 %	71.4 %	100 %	64.2 %	92.8 %
positiver prädiktiver Wert	91.6 %	71.4 %	100 %	58.3 %	90.0 %
negativer prädiktiver Wert	92.8 %	83.3 %	87.5 %	64.2 %	100 %
Diagnostische Effizienz	92.3 %	76.9 %	92.3 %	61.5 %	69.6 %

Fig 6: Diagnostische Wertigkeit von Cholin, Cholin-Derivaten und Trimethylammonium-Derivaten (CCTD) im Vergleich zu anderen Infarkt-Markern in der Spätphase des AMI (7-35 h)
 Probennanzahl (n) Infarktgruppe: CCTD n=12, CK/CK-MB/Myoglobin (Myo) n=12, Troponin I/T (cTnI/T) n=9; Vergleichsgruppe: alle Marker n=14

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/05911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MEDLINE, Washington DC USA; abstract no. 88118997, abstract XP002124744 cited in the application & P.B. CORR ET AL.: "Lysophosphoglycerides and ventricular fibrillation early after onset of ischemia." JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, vol. 19, no. supplement 5, 1 October 1987 (1987-10-01), pages 45-53, St. Louis MI USA -----</p>	1-11

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 December 1999

Date of mailing of the international search report

21/12/1999

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-20-0, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05911

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/92

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>MEDLINE, Washington DC USA; abstract no. 88118997, abstract XP002124744 in der Anmeldung erwähnt & P.B. CORR ET AL.: "Lysophosphoglycerides and ventricular fibrillation early after onset of ischemia." JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, Bd. 19, Nr. supplement 5, 1. Oktober 1987 (1987-10-01), Seiten 45-53, St. Louis MI USA</p> <p>-----</p>	1-11

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
3. Dezember 1999	21/12/1999
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Van Bohemen, C

THIS PAGE BLANK (USPTO)